



EPO - Munich
83

11. Aug. 2003

REC'D 09 SEP 2003

WIPO

PCT

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 103 15 846.4

Anmeldetag: 2. April 2003

Anmelder/Inhaber: Capsulation NanoScience AG, Berlin/DE

Bezeichnung: Farbkodierte Layer-by-Layer Mikrokapseln als kombi-
natorische Analysebibliotheken und als spezifische
optische Sensoren

IPC: B 01 J, A 61 K, G 01 N

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprüng-
lichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 6. August 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Klostermeyer

BEST AVAILABLE COPY

**Farbkodierte Layer -by-Layer Mikrokapseln als kombinatorische
Analysebibliotheken und als spezifische optische Sensoren**

Anmelder:

Capsulation Nanoscience AG
Volmer Str. 7b
12489 Berlin
Deutschland

Erfinder:

Dähne, Lars; Stillerzeile 3, 12587 Berlin
Baude, Barbara; Schwielowsestr. 84c, 14548 Caputh
Voigt, Andreas; Ahrenshooper Str. 67, 13051 Berlin

Farbkodierte Mikrokapseln als kombinatorische Analysebibliotheken und als spezifische optische Sensoren

5

Zusammenfassung

Monodisperse Kolloide wurden mit Polyelektrolyten mittels des Layer-by-Layer Verfahrens beschichtet. Die Templatkerne können im Inneren verbleiben oder aufgelöst werden. An die Polyelektrolyten werden verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe in
10 definierter Menge kovalent gebunden. Die Farbstoffmenge wird über Variation des Labelgehalts oder durch Co-Abscheidung ungelabelter Polymere kontrolliert. Unterschiedliche Farbstoffschichten werden durch Zwischenschichten voneinander getrennt, wodurch unerwünschte Wechselwirkungen unterdrückt werden. Umgekehrt kann zwischen geeigneten Farbstoffpaaren bei geringen Abständen (0 – 6 nm) ein
15 FRET-Signal erzeugt werden, welches unabhängig von der Farbstoffkonzentration durch die Anzahl der Zwischenschichten kontrolliert werden kann. Die Kapselkodierung wird durch Variation der Anregungs- und Emissionswellenlänge ausgelesen. In den Kapseln können Makromoleküle immobilisiert werden, welche komplementäre Substanzen aus Lösungen herausfischen.

20

Derart beschichtete Partikel oder hohle Kapseln können nach Einbringen einer sensitiven Zwischenschicht als Sensoren genutzt werden. Änderungen in der Größe/Struktur der Zwischenschicht kann entweder durch FRET zwischen
benachbarten, gelabelten Polyelektrolytschichten oder durch
25 Selbstlöschung/Aggregatfluoreszenz von Farbstoffen in der sensitiven Schicht detektiert werden.

Farbkodierte Layer-by-Layer Mikrokapseln als kombinatorische Analysebibliotheken und als spezifische optische Sensoren

Ansprüche

1. Kapseln aus Polyelektrolyt-Multischichten hergestellt nach dem Layer-by-Layer Verfahren und kleiner als 100 μm für Kodierungs- und sensorische/diagnostische/analytische Anwendungen und enthaltend
 - a) eine definierte Zuordnung von farbstoffmarkierten Polyelektrolyten zur Schichtzahl,
 - b) eine definierte Zuordnung von farbstofffreien Polyelektrolyten zur Schichtzahl,
 - c) eine definierte Zuordnung von sensorischen Polyelektrolyten oder sensorisch reaktiven Beschichtungskomponenten zur Schichtzahl
 - d) eine definierte Zuordnung von Wechselwirkungen der Markierungen unterschiedlicher Schichten
2. Kapseln nach Anspruch 1 mit Kern oder ohne Kern als Hülle enthaltend das Lösungsmittel oder eine Lösung anderer Zusammensetzung.
3. Kapseln nach Anspruch 1 und 2 enthaltend einen oder mehrere Fluoreszenzfarbstoffe in mindestens zwei Schichten, die es gestatten, sowohl die Fluoreszenzfarben als auch deren Intensitäten und die Wechselwirkungen bzw. Selbstwechselwirkungen definiert einzustellen.
4. Kapseln nach einem der vorherigen Ansprüche enthaltend mindestens zwei Fluoreszenzfarbstoffe in unterschiedlichen Schichten, die miteinander über Förster Resonanz Energie Transfer (FRET) verknüpft sind.
5. Kapseln nach einem der vorherigen Ansprüche mit mindestens einer, zwischen zum FRET befähigten Donor- und Akzeptor-Fluoreszenzfarbstoff-markierten

Schichten gelegenen sensorischen Zwischenschicht, die in Anpassung an veränderte Eigenschaften des Mediums, z.B. pH, Salzkonzentration, Temperatur, adsorbierte Komponenten, Enzyme, das Lösungsmittel beeinflussende oder mit der Zwischenschicht reagierende Komponenten sowie mischbare Lösungsmittelanteile, das FRET Signal messbar beeinflusst und für diese Änderung als Sensor dienen kann.

6. Kapseln nach einem der vorherigen Ansprüche enthaltend mindestens zwei Fluoreszenzfarbstoffe, deren Abstand voneinander den Förster Resonanz Energie Transfer unterbindet.

7. Kapseln nach einem der vorherigen Ansprüche enthaltend mindestens eine Schicht mit einem Fluoreszenzfarbstoff in einer Dichte, die zur Selbstwechselwirkung (Selbstlöschung) innerhalb der Schicht führen kann und durch Änderungen von Komponenten oder Bedingungen des Mediums oder der Umgebung messbar beeinflusst werden kann und dafür als Sensor dienen kann.

8. Kapseln nach einem der vorherigen Ansprüche wobei die Kapseln kleiner als $10\mu\text{m}$, bevorzugt kleiner als $1\mu\text{m}$ sind.

9. Kapseln nach einem der vorherigen Ansprüche mit einem modifizierten Kern, der sensorische Funktionen oder Kodierungseigenschaften besitzen kann.

10. Verwendung der Kapseln nach einem der vorherigen Ansprüche als Bibliothek von Reporter-Partikeln oder kodierten Farbpartikeln zur Identifikation von Substanzen und/oder der Markierung von Prozessen.

11. Verwendung der Kapseln nach einem der vorherigen Ansprüche in der medizinischen Diagnostik, der kombinatorischen Chemie, der Genomik und Proteomik, der Biologie und Biotechnologie und der Technik.

12. Verwendung der Kapseln nach einem der vorherigen Ansprüche zur Codierung von technischen Erzeugnissen.

13. Verwendung der Kapseln nach einem der vorherigen Ansprüche zur Markierung von Partikel, Zellen, Geweben, Organen und Organismen biologischen Ursprungs.

Farbkodierte Layer -by-Layer Mikrokapseln als kombinatorische Analysebibliotheken und als spezifische optische Sensoren

5

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft kombinatorische Bibliotheken auf der Basis von
10 hohlen oder gefüllten Polyelektrolytkapseln, die mittels der Layer by Layer Methode
hergestellt werden. Die LbL Methode ermöglicht die Kontrolle der Anzahl, der
Konzentration und des Abstandes zwischen den Farbstoffmolekülen auf der
Nanometerskala, wodurch sich eine höhere kodierte Informationsmenge in der Wand
(Hülle) ergibt, als es von Partikeln (Beads, volle Mikropartikel) bekannt ist, die in ihrem
15 Volumen oder an ihrer Oberfläche farblich kodiert sind. Weiterhin ist der
Fluoreszenzfarbstoff vollständig an der Oberfläche konzentriert, was für FRET basierte
Detektion in homogenen Partikelassays von Vorteil ist, da die hohe
Untergrundfluoreszenz der im Inneren des Partikels lokalisierten und daher nicht am
FRET beteiligten Farbstoffe vollständig wegfällt.¹³ Der zweite Teil der Erfindung
20 befasst sich mit der Möglichkeit, Kapseln mit unterschiedlichen Makromolekülen zu
füllen, jedoch die Kapseln weiterhin permeabel für kleine Moleküle zu halten. Derartige
farbkodierte Kapseln können als kombinatorische Fangbehälter verwendet werden,
welche eine erhebliche Menge von spezifischen Substanzen aus einem
Reaktionsgemisch aufnehmen können. Nachfolgend können die unterschiedlichen
25 Kapseln mit unterschiedlichen Substanzen in ihren ~~Inneren~~ aufgrund ihrer spezifischen
Fluoreszenzsignale aussortiert werden. Diese kombinatorischen Bibliotheken können in
vielen Gebieten in der Medizin, der Biologie und der Chemie angewendet werden.

Die Miniaturisierung von Assays und Mikrotiterplatten ist im Hinblick auf eine weitere
30 Vergrößerung der Assayskapazität begrenzt. Eine alternative Methode eröffnen die auf
Beads basierenden Bibliotheken. Neue Entwicklungen in der Flußzytometrie (Flow
Cytometrie; z.B. COPAS™ bead flow sorting) erlauben einen Durchsatz von bis zu
100.000 Partikel pro Stunde. Daher könnten die auf Beads basierenden Bibliotheken die
führende Technologie in Screening-oder Sammeloperationen werden.^{1-5,7}

Wir haben hohle Kapseln aus Polyelektrolyten⁶ hergestellt, welche unterschiedliche Farbkombinationen in ihrer Wand enthalten. Die farbkodierten Kapseln können wie Beads sortiert werden, jedoch sind sie hohl und können viele Bindungsstellen sowohl auf der Wandoberfläche als auch in ihrem Inneren aufweisen.

5

Diese Kapseln haben im Vergleich zu der Beads-Technologie verschiedene Vorteile:

1. Ihrer Masse ist sehr gering. Daher fallen Sie aus Lösungen mit unterschiedlicher Dichte wesentlich langsamer als Beads aus.
- 10 2. Infolge ihrer dünnen Wand und dem gleichen oder ähnlichem Material im Inneren wie im Äußeren ist die Lichtstreuung sehr klein. Bei Beads führen Unterschiede im Brechungsindex zwischen Bead und dem Lösungsmittel (gewöhnlich Wasser) zu starker Lichtstreuung, die den Sortierprozeß im Flußzytometer beeinträchtigt.
- 15 3. Reaktionen sind bei Beads nur an deren Oberfläche möglich. Daher ist die Anzahl ihrer Bindungsstellen stark begrenzt. Im Falle unserer Kapseln können die äußere Wandoberfläche, die innere Wandoberfläche und das gesamte Volumen der Kapseln für Reaktionen genutzt werden. Eine Kapseln (oder ein Bead) mit einem Durchmesser von 5 μm hat eine äußere Oberfläche von 78 μm^2 und ein Volumen von 65 μm^3 . Unter Annahme einer Konzentration der Bindungsstellen von 0.1 M weist ein Bead lediglich etwa 9×10^4 Bindungsstellen auf, wohingegen eine Kapseln etwa 5000 mehr Bindungsstellen, nämlich 4×10^8 Bindungsstellen aufweist.
- 20 4. Die Farbstoffmarkierungen können mit ausreichendem Abstand untereinander aufgebracht werden, um Wechselwirkungen wie die Bildung von H- oder J-Aggregaten, Selbstlöschung oder Förster-Resonanzenergietransfer zu vermeiden, welche die Fluoreszenzsignale im Falle der Markierung der Festkörperphase mit unterschiedlichen Farbstoffen stören. Dies gestattet mehr kombinatorische Möglichkeiten.
- 25 5. Förster Resonanzenergietransfersignale können kontrolliert zur fälschungssichere Kodierung von Handelsmarken eingestellt werden.
- 30

6. Der Innenraum der Kapseln kann mit hochaktiven Biowirkstoffen wie Enzyme, DNS oder dergleichen oder mit spezifisch funktionalisierten Polyelektrolyten gefüllt werden, welche ein selektives Fangen von Reaktionspartnern aus der Lösung durch Bioreaktionen, Physi- oder Chemisorption ermöglichen. Nachfolgend können die kodierten Kapseln aussortiert werden.
7. Die kodierte Information kann durch die Anzahl der Farbstoffen, ihr Verhältnis untereinander und durch abstandesabhängige Wechselwirkungen untereinander wie etwa dem Förster Resonanzenergietransfer eingestellt werden. Bei den bekannten fluoreszierenden Beads⁴ sind solche Wechselwirkungen unerwünscht, da der Abstand zwischen den Farbstoffmolekülen nicht kontrollierbar ist.
8. Herstellung von hohlen kodierten Kapseln und Nutzung ihres Innenraums für die Immobilisierung von Makromolekülen (Polyelektrolyte, Proteine, Enzyme). Die funktionalisierten Makromoleküle können komplementäre Verbindungen aus Reaktionslösungen durch Physisorption, Chemisorption biologische Bindungen herausfischen.

Die vorliegende Erfindung betrifft Sensoren, die mittels der Layer-by-Layer LbL Methode auf Kolloiden mit Durchmessern kleiner als 100 µm aufgebaut werden und auf chemische Stoffe oder physikalische Meßgrößen ansprechen. Das kolloide Templat kann gegebenenfalls in einem Folgeschritt herausgelöst werden, so dass hohle Kapseln entstehen.

Die Sensorwirkung wird durch eine Schicht definierter Dicke eines speziellen Materials erreicht, dass bei Änderung der Konzentration eines Stoffes in der umgebenden Lösung oder bei der Veränderung physikalischer Parameter entweder quillt oder schrumpft. Zur Detektion dieses Prozesses wird die Emission von Fluoreszenzfarbstoffen verwendet. Zwei Varianten der Wirkungsweise sind möglich (Abbildung 8):

1. Die sensitive Schicht mit einer Dicke zwischen 0,1 nm und 10 nm befindet sich zwischen zwei Schichten aus Polyelektrolyten. Die Polyelektrolytschicht auf der einen Seite der sensitiven Schicht enthält fest eingebunden einen Fluoreszenzfarbstoff höherer

- Absorptionsenergie (Donor) und die Polyelektrolytschicht auf der anderen Seite einen Fluoreszenzfarbstoff niedrigerer Absorptionsenergie (Akzeptor). Statt Fluoreszenzfarbstoffen können auch emittierende Nanopartikel verwendet werden. Das Farbstoffpaar ist so abgestimmt, dass ein Förster (Fluoreszenz-) Resonanzenergietransfer FRET stattfindet. Die Effizienz des FRET hängt empfindlich von dem Abstand der Farbstoffmoleküle zueinander ab. Das FRET Signal kann spektrometrisch sowohl anhand der Donor- als auch der Akzeptorfluoreszenz statisch sowie anhand der Donorfluoreszenz auch zeitabhängig detektiert werden.
2. Das sensitive Material wird kovalent mit einem Fluoreszenzfarbstoff in vergleichsweise hoher Konzentration (Masse Material: Masse Farbstoff < 500:1) verknüpft. Der Farbstoff zeichnet sich dadurch aus, dass er leicht mit sich selbst Dimere/Aggregate bildet. Wird das gelabelte Material in einer Kapselwand als mindestens eine homogene Schicht mit einer Dicke von 1 nm bis 1 µm eingebracht, führt ein Selfquenchingprozeß bei der Bildung von Dimeren oder H-aggregaten zu einer Löschung der Fluoreszenz des Farbstoffmonomeren, wohingegen bei Bildung von J-Aggregaten oder Excimeren eine neue Emissionsbande bei niedrigerer Energie entsteht. Bei Quellung/Schrumpfung der Schicht in der Kapselwand kann das Signal über die Intensität oder die Lebensdauer der Monomerfluoreszenz detektiert werden, bzw. über das Verhältnis von Monomerfluoreszenz zur Fluoreszenz des J-Aggregates bzw. Excimeren.

Beschreibung der Experimente

Farbstoffmarkierung von Polyelektrolyten:

PAH wurde mit den Farbstoffderivaten Fluoreszeinisothiocyanat, Tetramethylrhodaminisothiocyanat und einem Derivat von CY5 markiert. Die Formeln sind in Abbildung 1 dargestellt. Die Markierungsreaktionen wurde entsprechend allgemeiner Herangehensweise bei der Markierung von Proteinen durchgeführt. Anstelle eines Hydrogenkarbonatpuffers wurde NaOH für die Aktivierung von ca. 30% der PAH Gruppen verwendet. Das Reaktionsgemisch wurde gegen Wasser dialysiert. Nach Zugabe von HCL zu der markierten PAH-Lösung zur Einstellung eines pH-

Wertes von 4 – 5 wurde die Lösung lyophilisiert. Der Markierungsgehalt wurden mittels UV/Vis-Spektroskopie bestimmt und betrug für PAH-FI 53:1, PAH-Rho 580:1, PAH-Cy5 500:1 (Verhältnis der PAH Einheiten : Anzahl der markierten Moleküle). Die Ausbeute der Markierung betrug ca. 80% für Fluoreszein, 20% für Rhodamine und 40% für Cy5. Jedes PAH wurde nur mit einem Farbstoff markiert, da ein gleichzeitiges Markieren einer PAH-Kette den Nachteil der Selbstlöschung oder des Förster Resonanz Energie Transfer in sich birgt.

Die Absorptions- und Fluoreszenzspektren der Farbstoffe sind in Abb. 2a und b gezeigt. Die Absorptionsmaxima der drei markierten PAH-Polymere wurden zu 495, 557 und 648 nm bestimmt. Die Fluoreszenzmaxima betragen 520, 582 und 665 nm, wobei die Absorptionswellenlänge für die Anregung verwendet wurde.

Herstellung der Kapseln:

3 μm große Silicatemplate wurden mit 10 alternierenden Schichten von Poly(allylaminhydrochlorid) (PAH, MW 60.000 g/mol) und Poly(styrolsulfonat) (PSS, MW 70.000 g/mol) beschichtet.⁹ Um unterscheidbare Wände zu erhalten, wurden unterschiedlich markierte PAH-Polymere für die Beschichtung verwendet. Für die Färbung der Kapseln wurde lediglich eine Schicht des jeweiligen PAH verwendet. Nur im Falle von Cy5 wurden aufgrund der geringeren Fluoreszenzquantenausbeute und des geringen Farbstoffgehalts 2 Schichten zur Markierung verwendet. Es wurde versucht, einen gewissen Abstand zwischen den unterschiedlichen Farbstoffschichten zur Vermeidung von Förster-Resonanzenergietransfer einzuhalten. Folgende Kapseln wurden hergestellt:

Schicht/Kapsel	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.
1. PAH	-	-	-	-	-	-	-	-
2. PSS	-	-	-	-	-	-	-	-
3. PAH	-	-	-	Cy5	Cy5	Cy5	Cy5	-
4. PSS	-	-	-	-	-	-	-	-
5. PAH	Rho	Rho	Fluo	Cy5	Cy5	Cy5	Cy5	-
6. PSS	-	-	-	-	-	-	-	-
7. PAH	-	-	-	-	Fluo	Rho	Fluo	-
8. PSS	-	-	-	-	-	-	-	-
9. PAH	-	Fluo	-	-	-	-	Rho	-
10. PSS	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabelle 1: Farbkodierte Kapseln mit unterschiedlichen Arten von PAH-Farbstoff Schichten

Hohle Kapseln wurde durch Auflösen des Silicatemplats mittels Fluorwasserstoffsäure und Waschen mittels Wasser gewonnen.

Die Kapseln wurden mittels konfokaler Laserscanningmikroskopie unter gleichzeitiger Verwendung von 3 unterschiedlichen Kanälen untersucht (Abb. 3a – c). Die Anregungswellenlänge der Laser war 488 nm für Fluoreszein, 543 nm für Rhodamin und 633 nm für Cy5. Die Detektoren wurden auf maximale Emission der Farbstoffe und auf einen minimalen Überlapp ihrer Fluoreszenzemission eingestellt. Die Laserintensitäten und die Detektorempfindlichkeiten wurden auf etwa gleiche Signalintensität für jeden Kanal eingestellt. Die Überlagerung der 3 Kanäle ergab 7 verschieden gefärbte Kapseln (Abb. 3d).

Eine quantitative und sichere Methode zur Unterscheidung der verschiedenen Kapseln bietet die Analyse der Fluoreszenzintensitäten entlang eines Profils durch die Kapseln. Die Profile zeigen die Verteilung der Fluoreszenzintensitäten von unterschiedlichen Kanälen der gleichen Kapsel. Abbildung 4a zeigt zum Beispiel das Profil der Kapseln des 2, 7, 1 und 5.

Die Fluoreszenzintensitäten pro Farbstoffschicht sind unterschiedlich für unterschiedlich gefärbte Kapseln, was auf Resonanzenergieeffekte und unterschiedlichem Gehalt an adsorbiertem Material zurückgeführt werden kann. Der Resonanzenergietransfer kann bei Verwendung mehrerer Schichten zwischen den Farbstoffschichten deutlich reduziert werden. Oberhalb eines Abstands von 6 nm (ca. 4 Schichten) treten nahezu keine Wechselwirkungen zwischen den Farbstoffmolekülen mehr auf.

Kontrollierter Förster-Resonanzenergietransfer

Um feste Abstände zwischen den Farbstoffmolekülen zum Schutz von Handelsmarken gegen eine Fälschung zu verwenden, wurden Kapseln mit unterschiedlichem Abstand der Farbstoffe aber gleichem Farbstoffgehalt hergestellt. Abbildung 5 zeigt die hergestellten Schichtkombinationen.

Die in den Kapseln mittels zwei Farbstoffen kodierte Information kann unter Verwendung von zwei unterschiedlichen Anregungswellenlängen und Fluoreszenzmessung bei zwei unterschiedlichen Wellenlängen ermittelt werden. Im Falle des Rhodamin/Fluoreszein-Systems bedeutet dies:

1. Anregungslicht bei 540 nm, Messung der Emission bei 576 nm: dies ergibt die absolute Konzentration von Rhodamine
2. Anregungslicht bei 495 nm, Messung der Emission bei 520 nm: dies ergibt die Konzentration von Fluoreszein abzüglich der Konzentration der Moleküle, die einen Energietransfer zu Rhodamin erfahren
3. Anregungslicht bei 495 nm, Messung der Emission bei 576 nm: dies ergibt die Intensität des FRET oder den mittleren Abstand zwischen den Farbstoffmolekülen (Fälschungsnachweis)

Jede der hergestellten Kapselarten ergibt ein spezifisches Verhältnis zwischen Signal 1 : Signal 2 : Signal 3. Für die Messung von kleinen Unterschieden in der Signalintensität genügen bereits diese zwei Farbstoffe, um eine große Anzahl von

Kodierungsmöglichkeiten zu realisieren. Jedoch kann die Anzahl der Farbstoffe in Kapseln bis zu 7 betragen.

Nutzung des Förster-Resonanzenergietransfers für sensorische Anwendungen

5 Für die Sensoranwendungen wurden die Kapseln 2 und 3 aus Tabelle 1 verwendet. Es wurde von uns gefunden, dass PAH/PSS Schichten bei Zugabe von Lösungen quarternärer Alkylammoniumsalze je nach Kettenlänge stark aufquellen oder auch schrumpfen. Ein starkes Quellen von (PAH/PSS)₅ Kapseln von 3 μm bis auf 5,7-6,0 μm wird bei Zugabe einer 0,05 M Dodecyltrimethylammoniumbromidlösung (DODAB) gefunden. Bei Verdoppelung des Kapseldurchmessers wird sich bei isotroper Quellung der Schichten der Abstand zwischen den Farbstoffschichten ebenfalls verdoppeln, wohingegen sich das Volumen einer Schicht um den Faktor 8 vergrößert.

15 Im Experiment 1 wurde die Kapsel 2 verwendet. Die Konzentration an Rhodamin und Fluoreszein in der Kapselwand wurde UV/VIS spektroskopisch vor und nach dem Quellvorgang bestimmt. Der mittlere Abstand zwischen beiden Farbstoffschichten betrug vor der Behandlung etwa 4,5 nm und danach nahezu 9 nm. Die Änderung des FRET Signals ($\lambda_{\text{exc}} = 495 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 578 \text{ nm}$) wurde mit dem Fluoreszenzspektrometer während des Quellvorgangs verfolgt (Abbildung 9). Durch die Quellung der Schichten 20 verringerte sich die FRET Signalintensität bei Reaktion mit 0,05 M DODAB um 86%.

Im Experiment 2 wurde die Kapselsorte 3 verwendet. Durch die hohe Fluoreszeinkonzentration in der einen PAH Schicht tritt ein effizienter Quenchprozeß auf. Nach Zugabe von 0,05 M DODAB Lösung vergrößert sich das Volumen der PAH 25 Schicht etwa um den Faktor 8. Durch die verringerte Selbstlöschung des Farbstoffes erhöht sich dadurch die Fluoreszenz der Kapseln um 290 % (Abbildung 10).

Füllen der Kapseln mit reaktiven Makromolekülen:

30 Es gibt drei unterschiedliche Wege für die Immobilisierung von Makromolekülen im Inneren der Kapseln:

1. "Schiff in Flasche" Synthese (ship in bottle synthesis) von Polymeren innerhalb der Kapseln (Abbildung 6).¹²

2. Schalten der Permeabilität von spezifischen Kapseln für korrespondierende Makromoleküle mittels Salze oder pH-Änderungen (Abbildung 7)¹¹
- 5 3. Bilden eines Niederschlags eines instabilen Komplexen aus den Makromolekülen und einer Hilfssubstanz auf dem kolloiden Templat. Nachfolgendes Einkapseln des Materials durch die übliche LbL-Methode und Auflösen des Kerns und des Makromolekülkomplexes.⁸

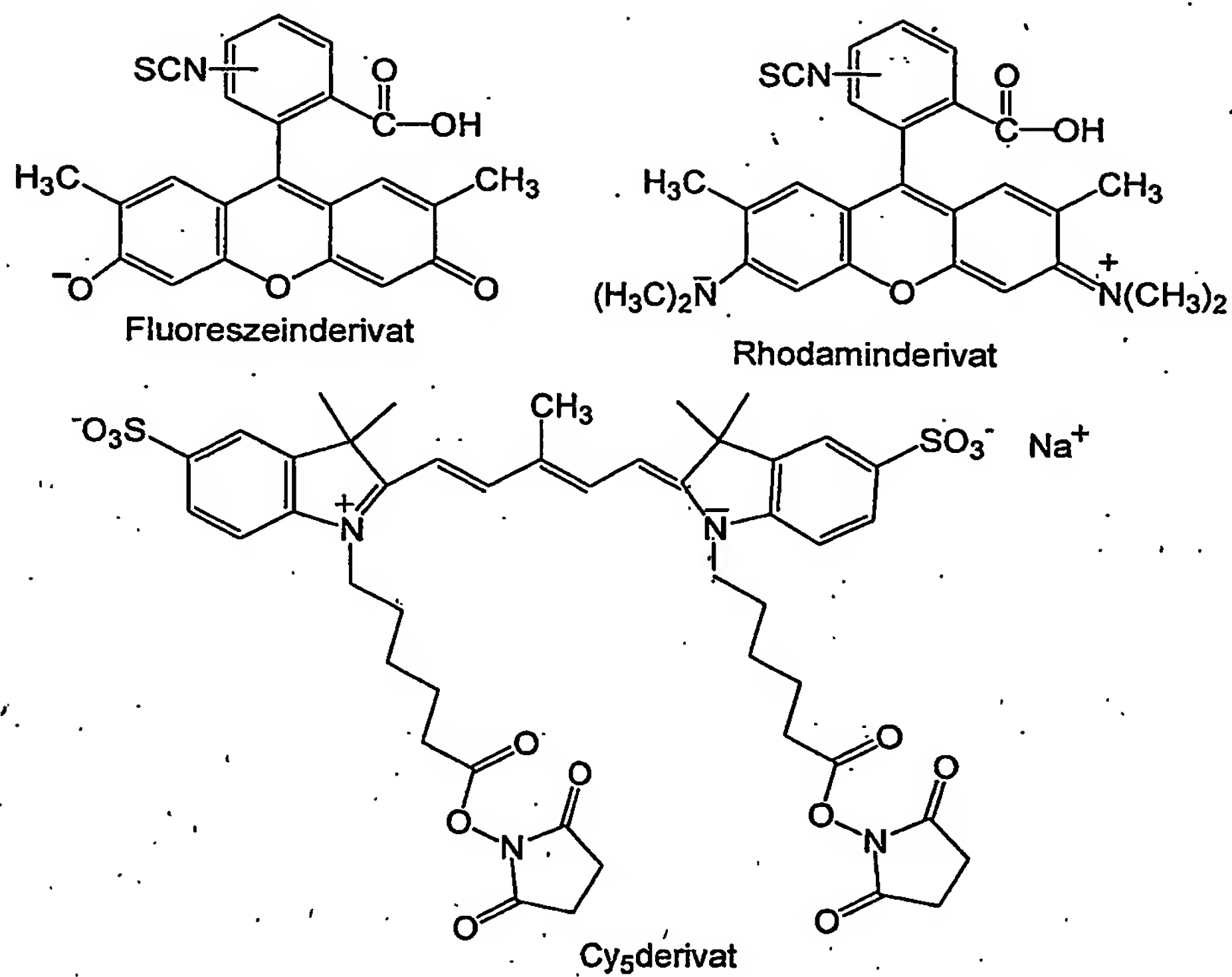
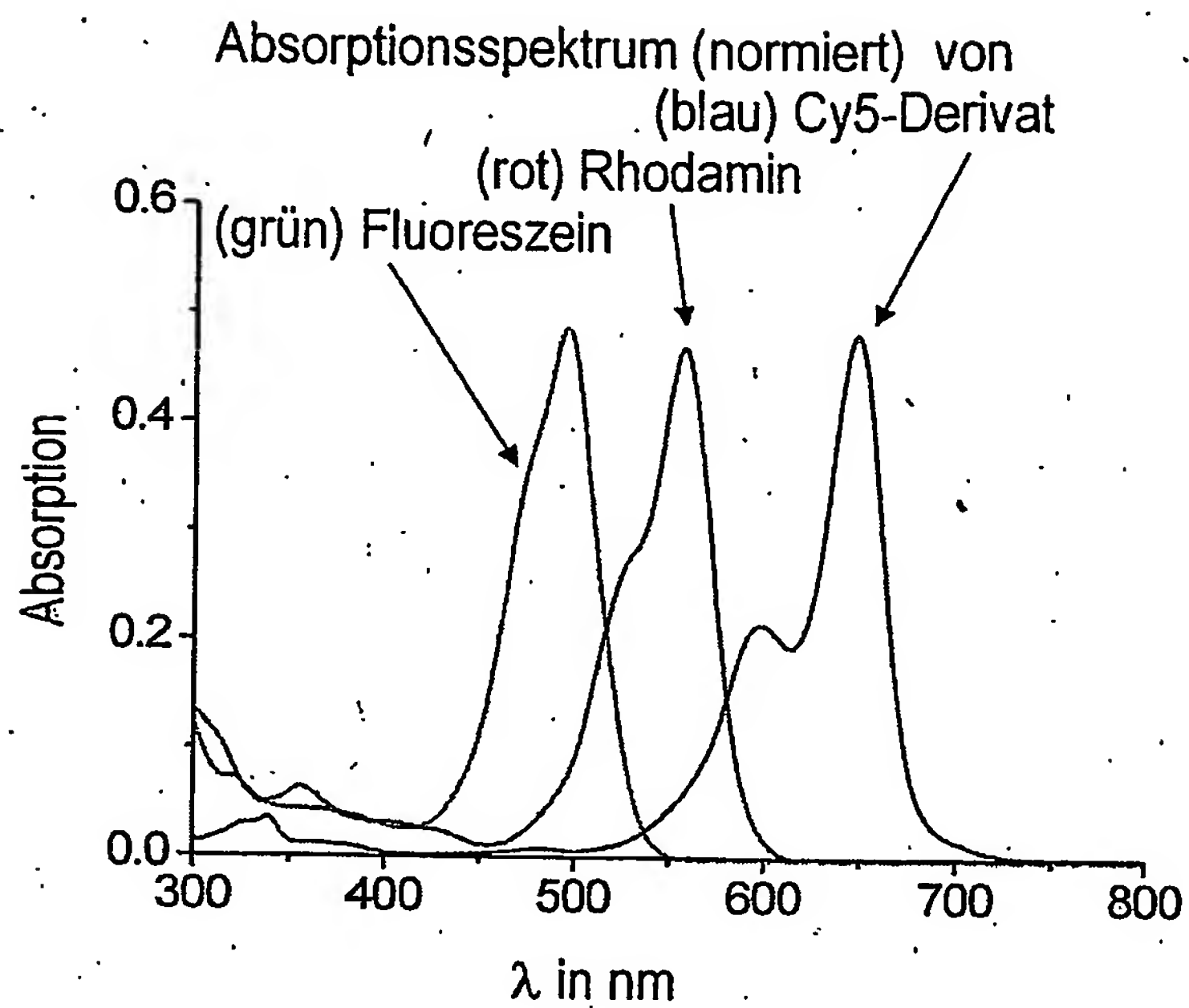


Abb. 1

a)



b)

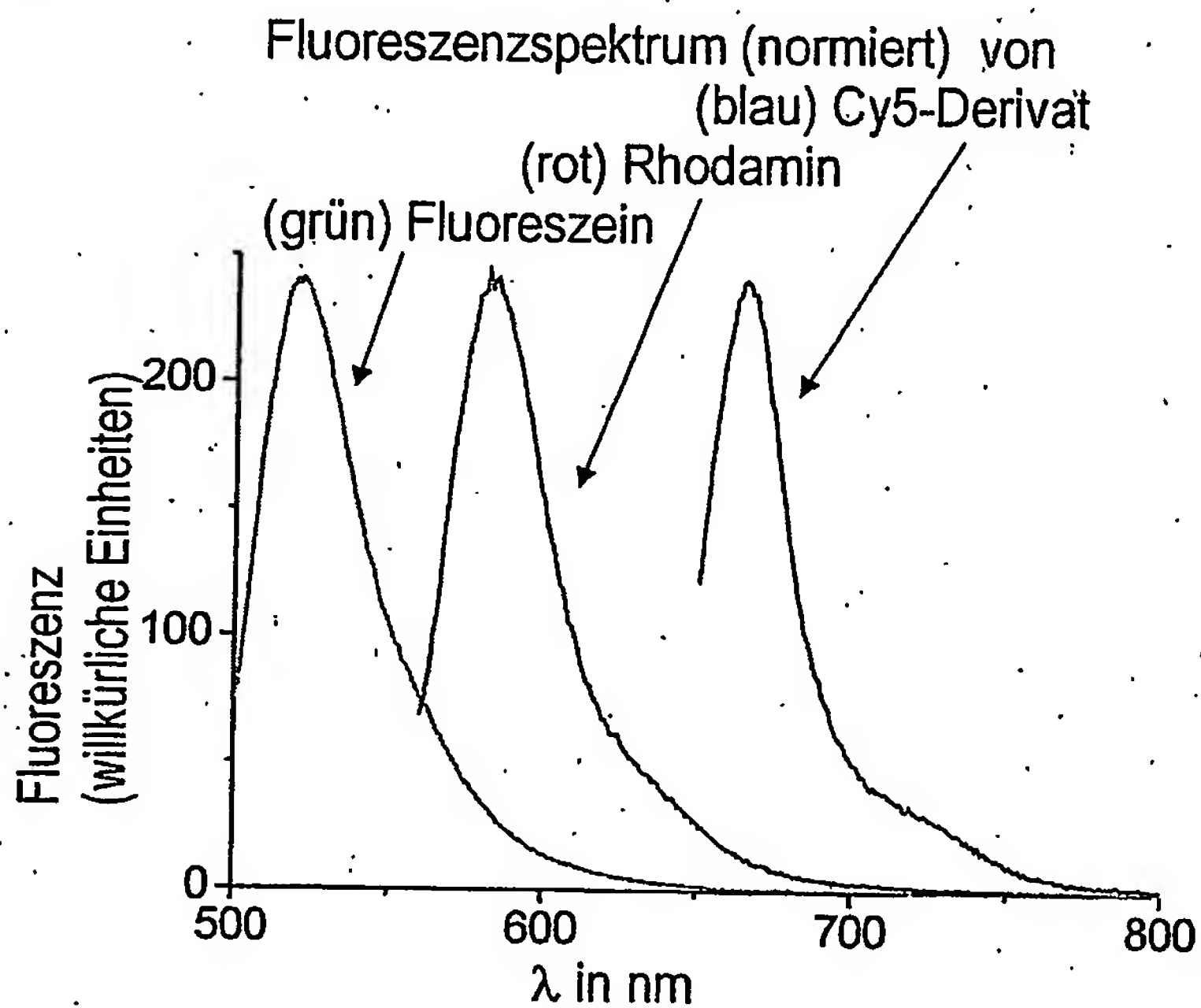


Abb. 2:

- a) Absorptionsspektrum von PAH-Fl, PAH-Rho und PAH-Cy5, normalisierte Intensität
b) Fluoreszenzspektrum von PAH-Fl, PAH-Rho und PAH-Cy5, normalisierte Intensität

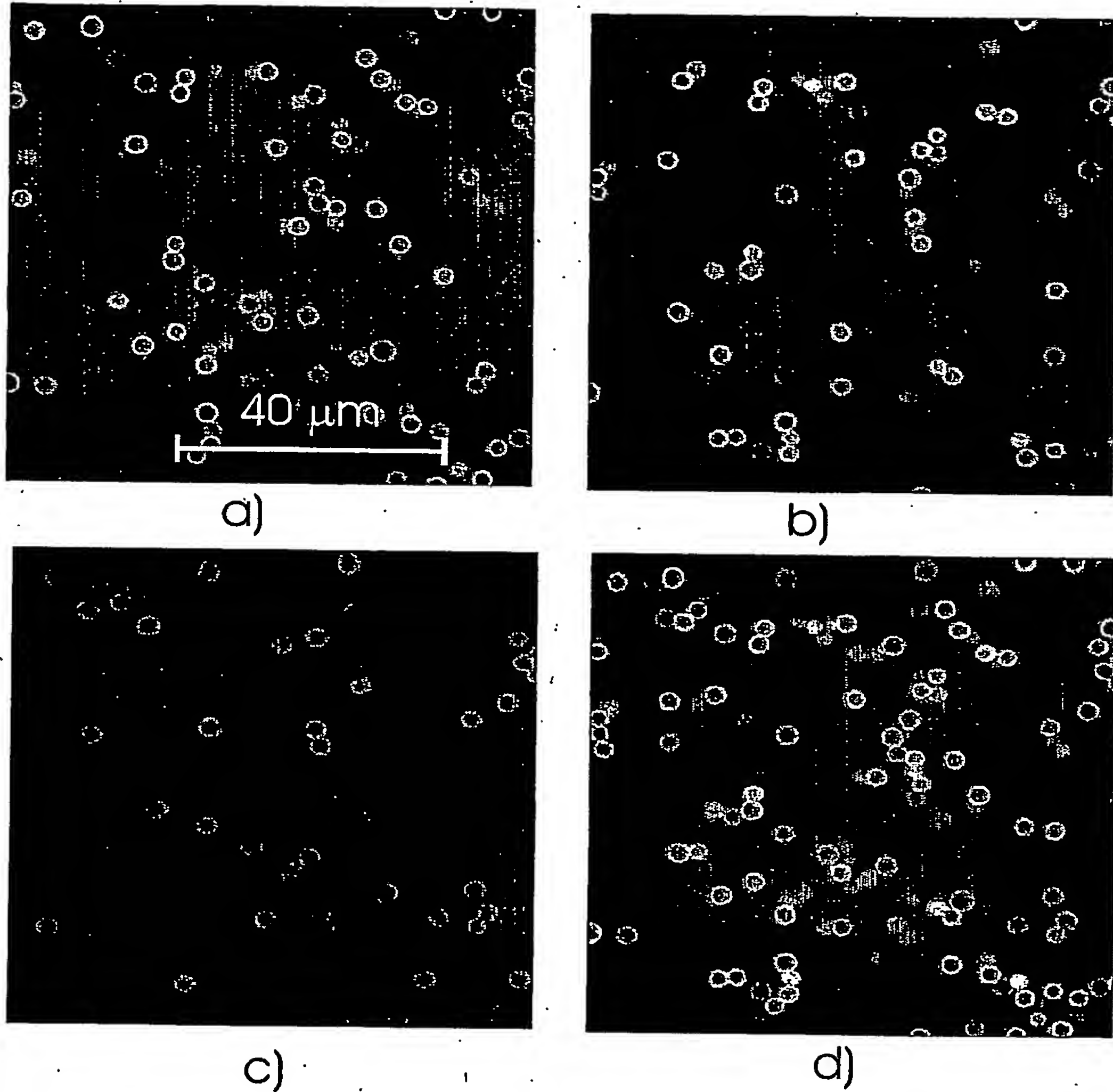


Abb. 3:

Konfokale Bilder einer Mischung von farbkodierten Kapseln

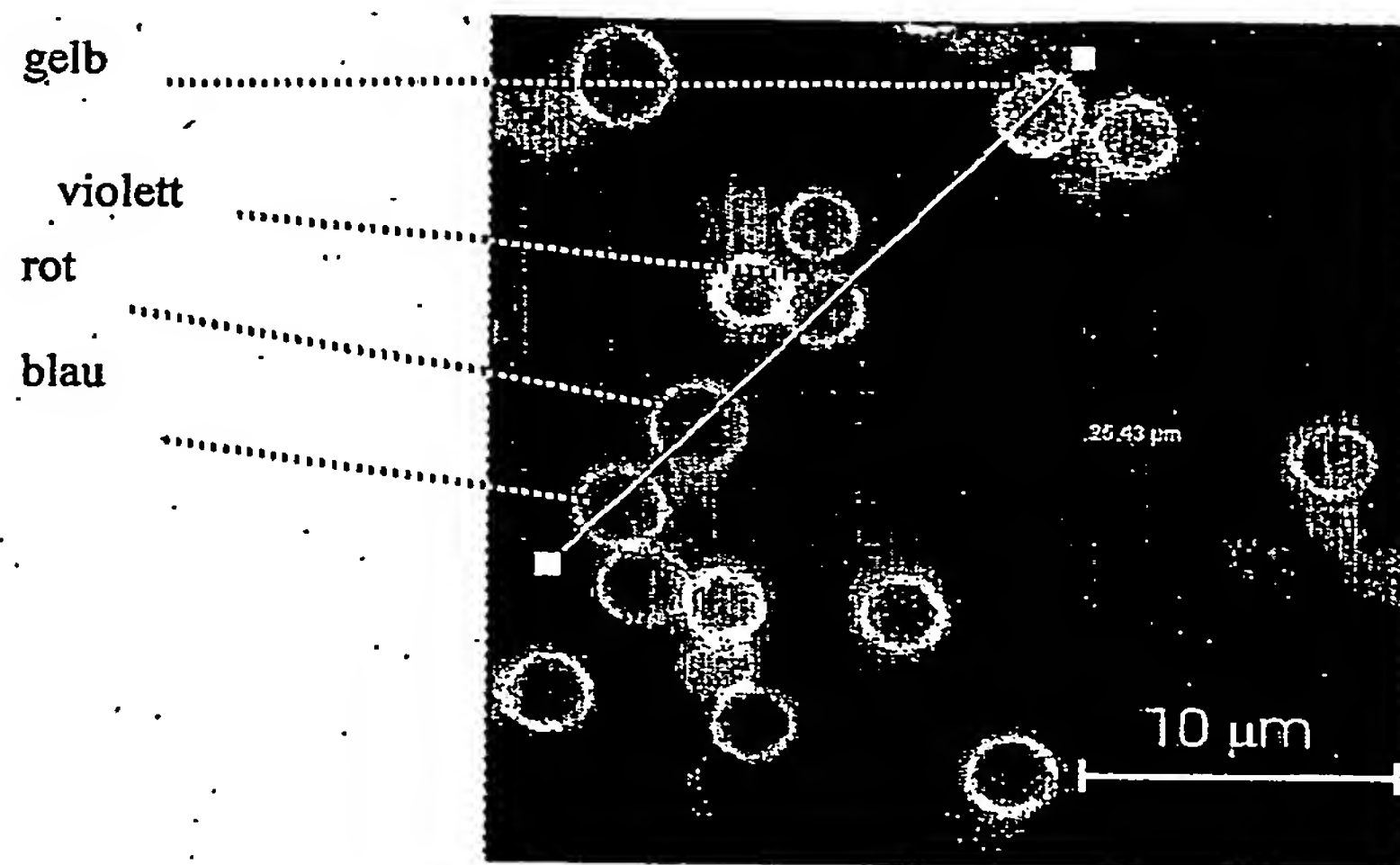
a) Fluoreszeinkanal

b) Rhodaminkanal

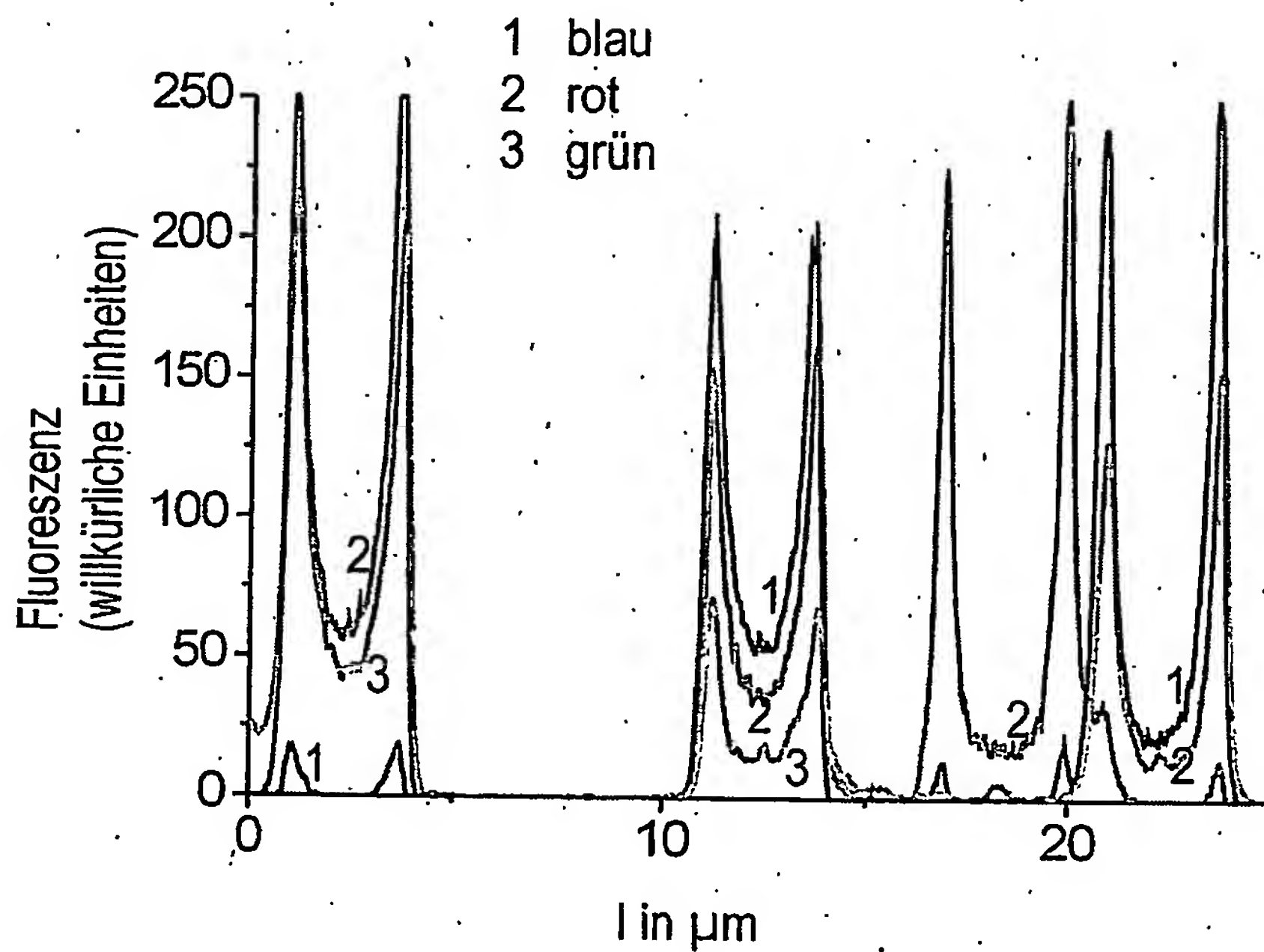
c) Cy5 Kanal

d) Überlagerung der 3 Farbkanäle

19



a)



b)

Abb. 4:

Konfokale Bilder einer Mischung von gefärbten Kapseln 2, 7, 1, 5

a) Überlagerungsbild der drei Farbkanäle

b) Profil der Fluoreszenzintensität entlang der weißen Linie im Bild a)

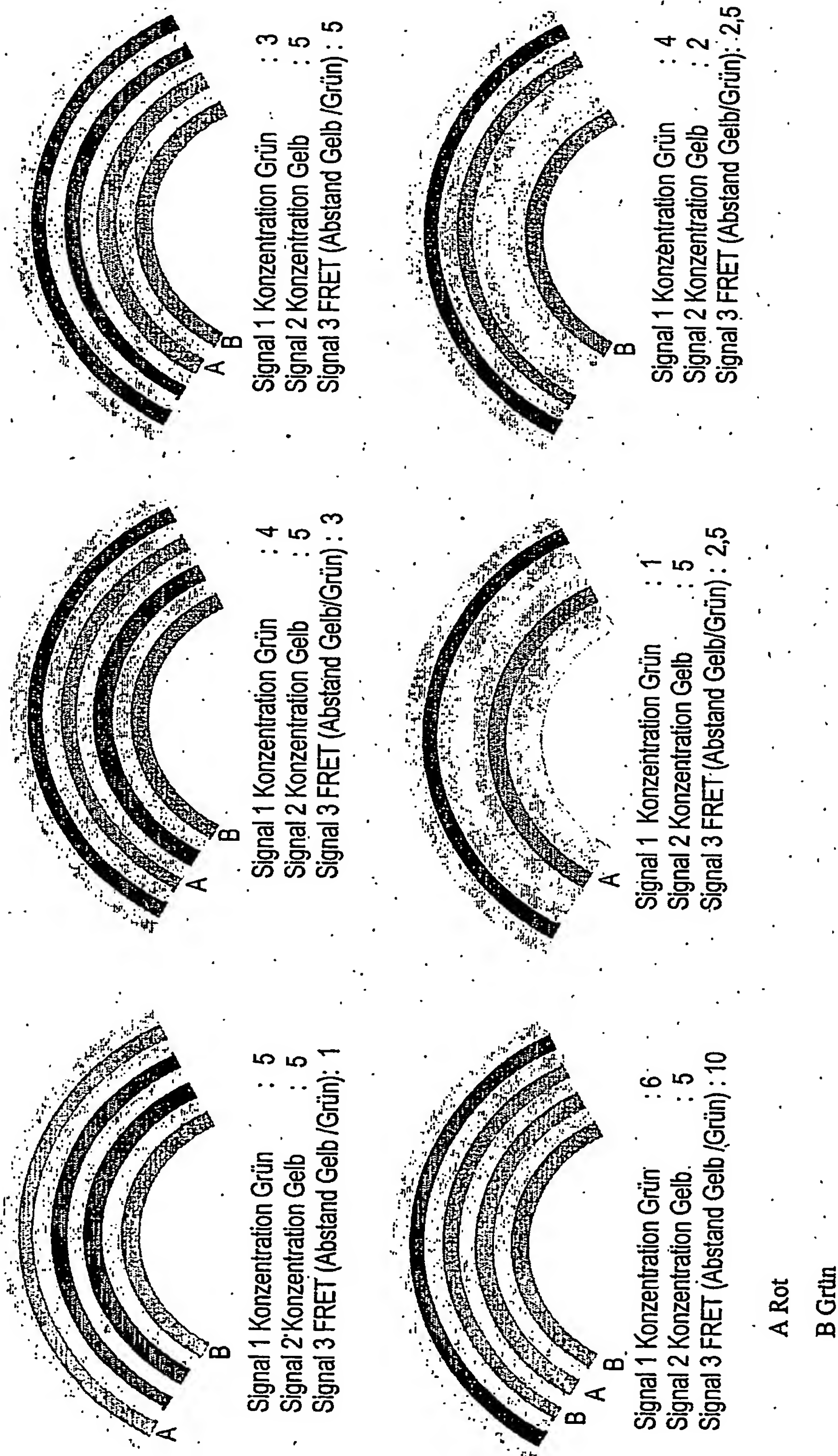


Abb. 5

Hergestellte Schichtkombinationen

a-c) unterschiedliche FRET-Signalintensitäten bei gleicher Farbstoffkonzentration

d-f) unterschiedliche FRET-Signalintensitäten bei unterschiedlicher Farbstoffkonzentration

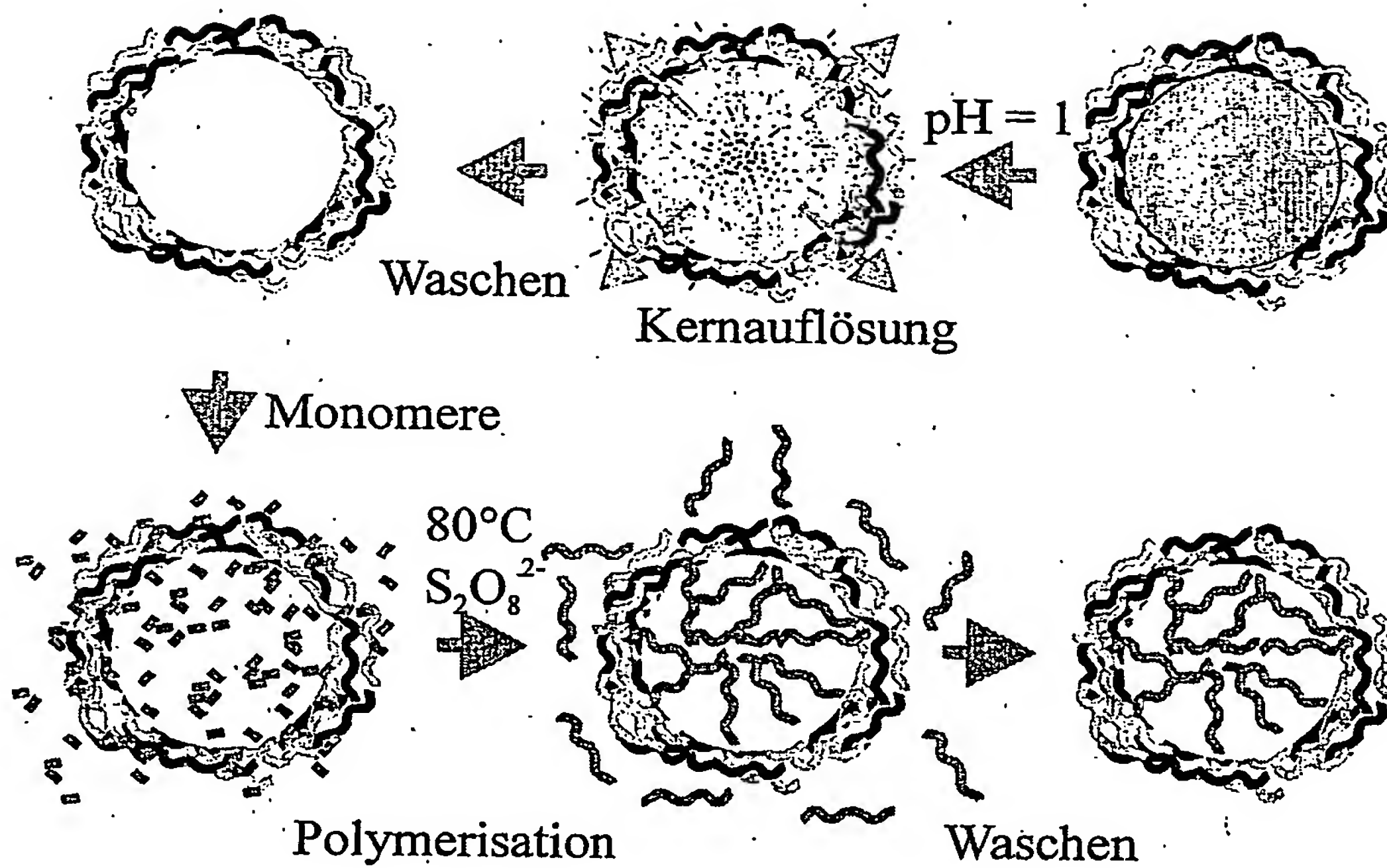


Abb. 6: „Schiff in Flasche“ Synthese der Polymere innerhalb der Kapseln

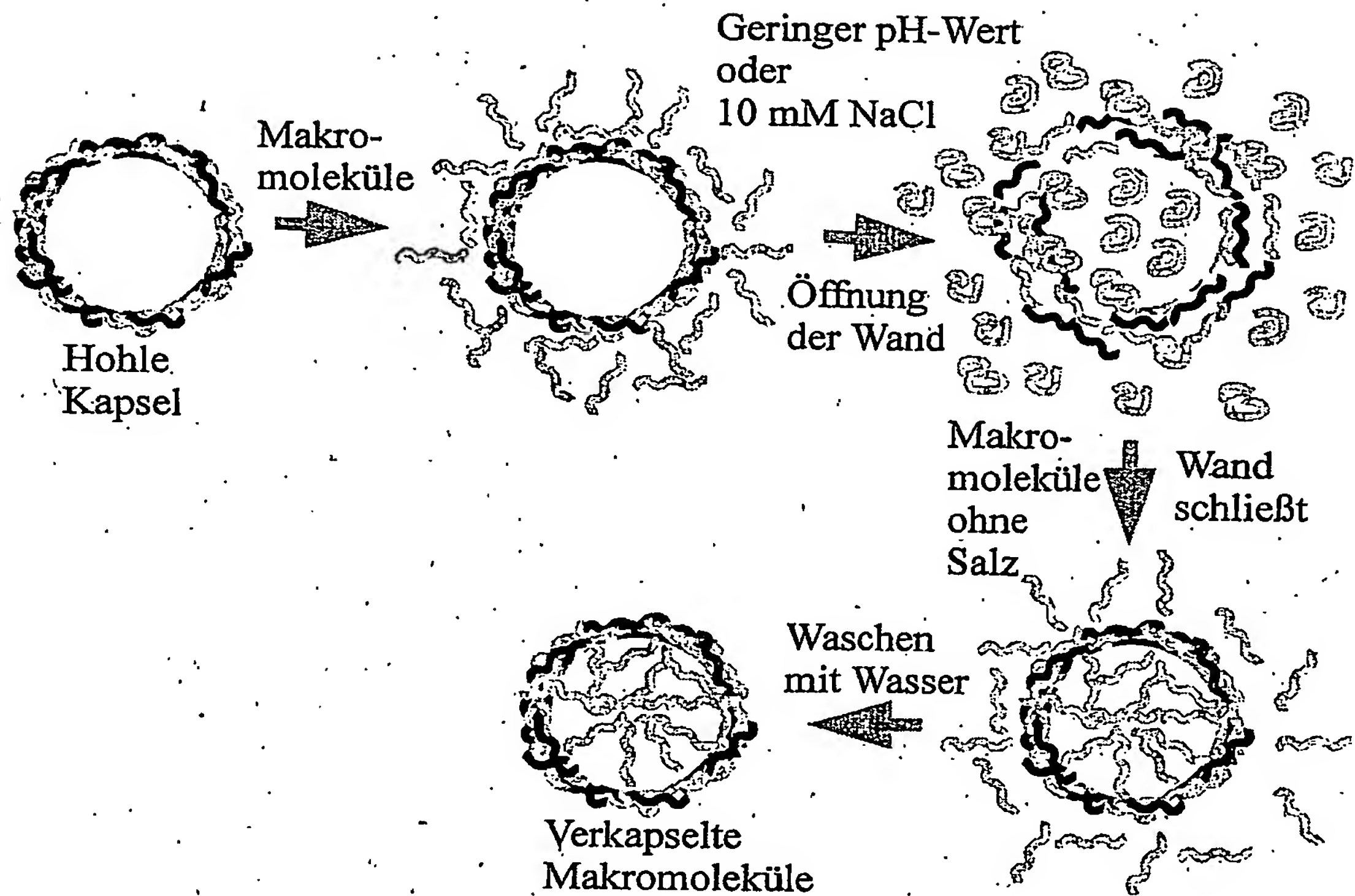


Abb. 7

Prinzip des Beladens von MF Kapseln (8 Schichten) durch Schalten der Permeabilität von speziellen Kapseln für korrespondierende Makromoleküle durch Salz oder pH-Wert

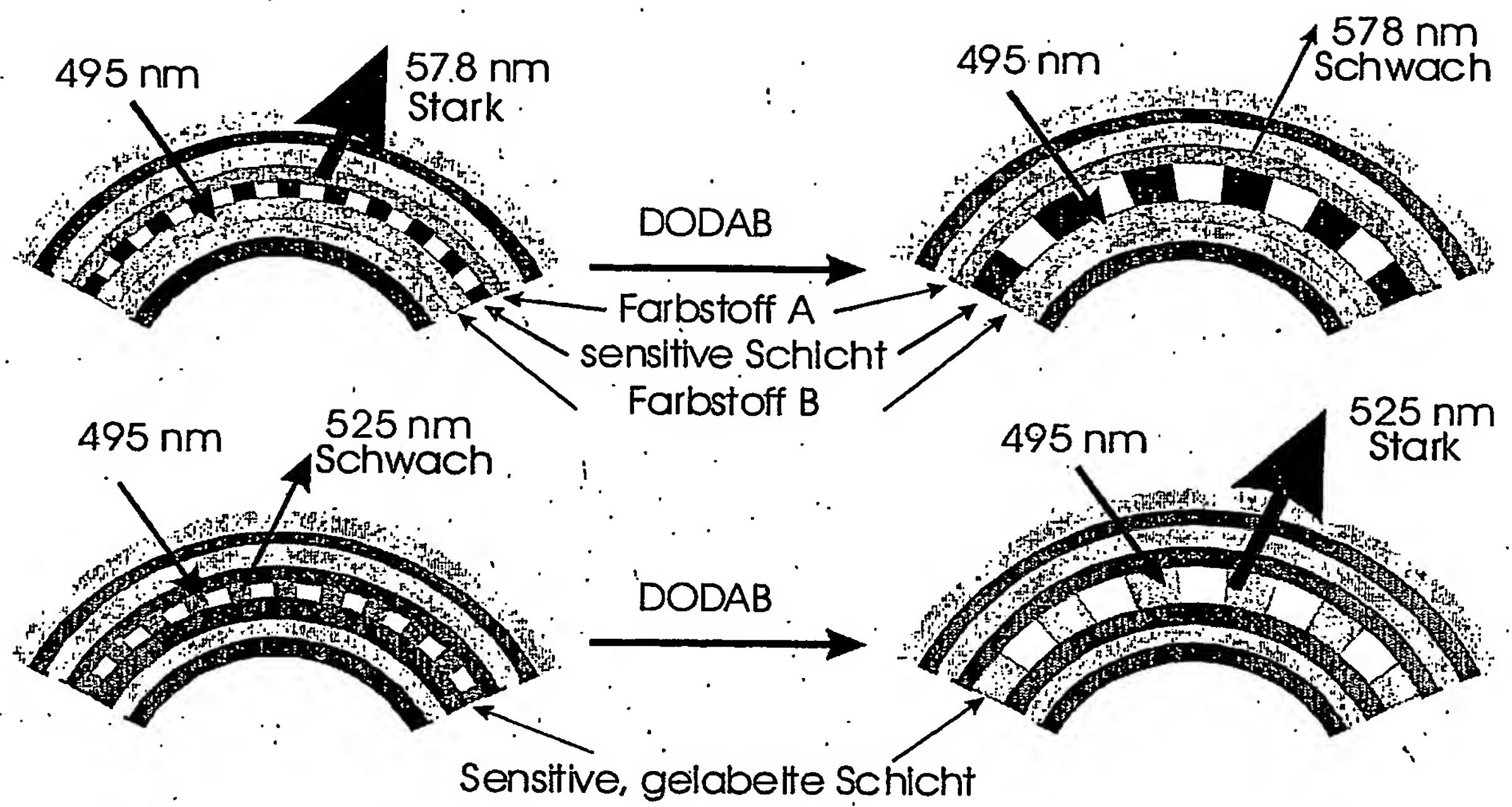
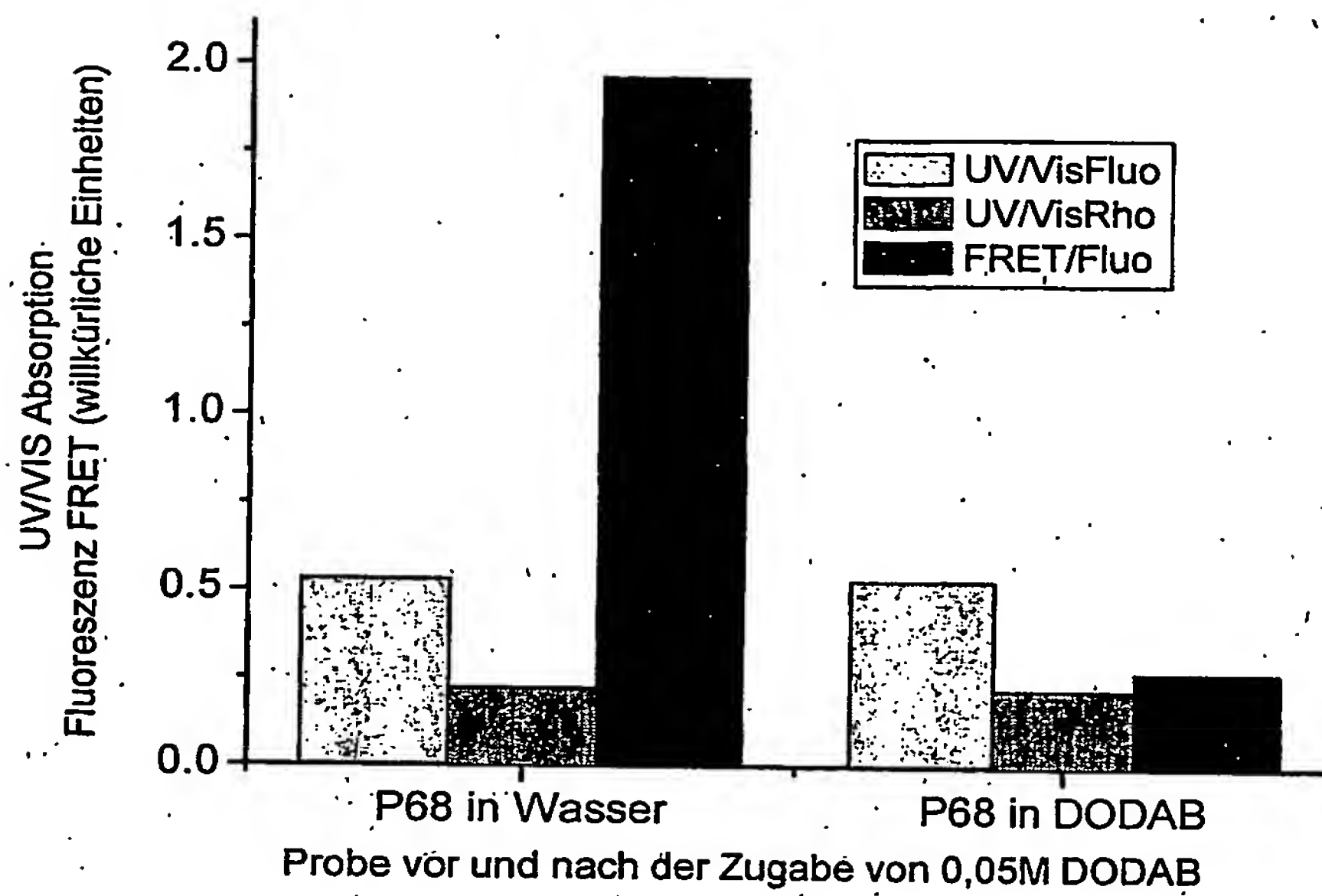
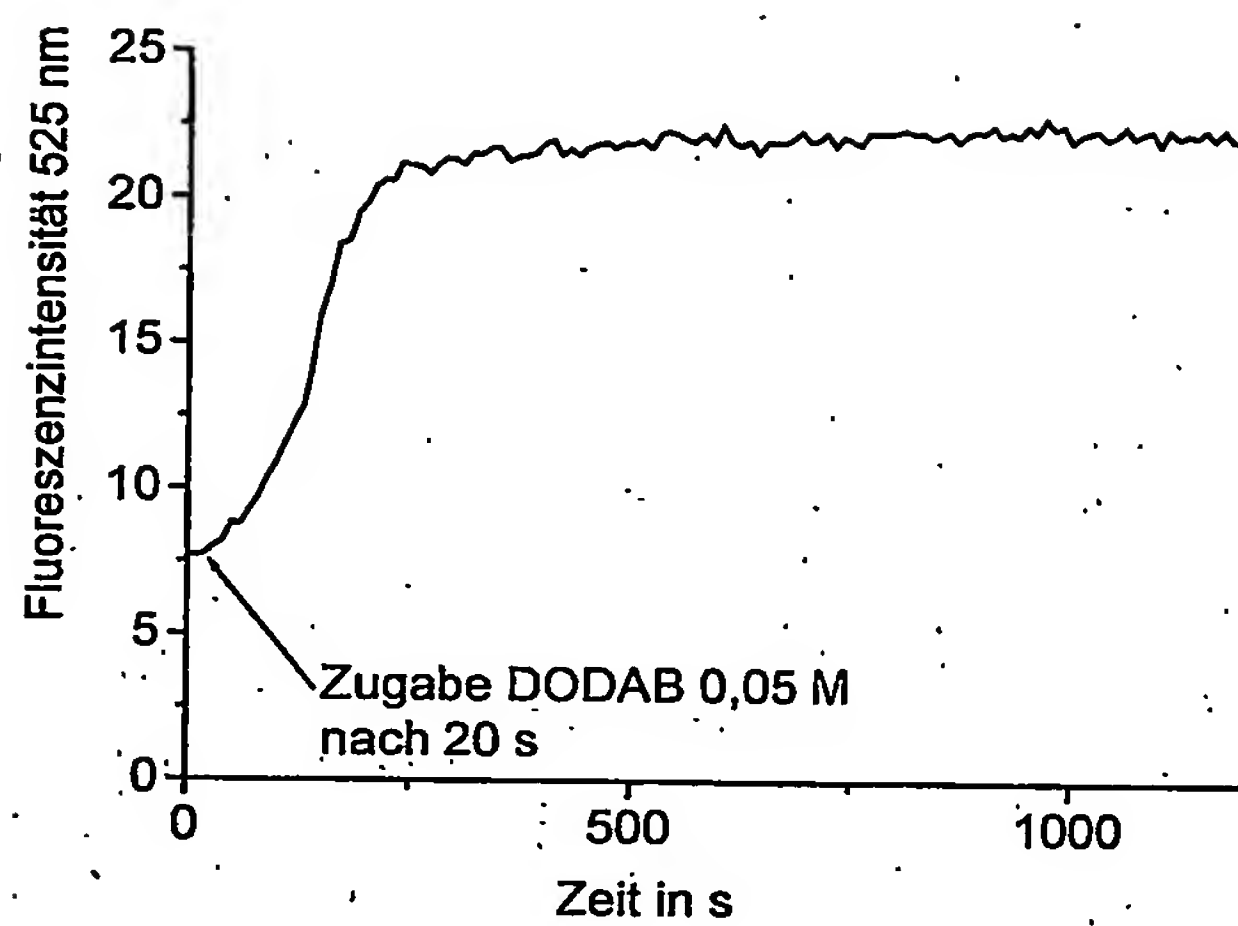


Abb. 8:

Schematischer Aufbau und Wirkungsweise der 2 verschiedenen Sensorkapseln

**Abb. 9:**

Signalintensitäten der Sensorkapseln Nr. 2 a) in Wasser, b) nach Einwirken einer 0,05 M DODAB Lösung: grün Absorption des Fluoreszeins bei 495 nm, rot – Absorption des Rhodamins bei 553 nm, blau FRET Signal $\lambda_{\text{exc}} = 495 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 578 \text{ nm}$

**Abb. 10:**

Fluoreszenzintensität von Kapseln Nr. 3 nach Zugabe von 0,05 M DODAB

Literatur

1. Battersby, Bronwyn Jean et. al. Patent WO 00/32542, Juni 2000
2. Payan, Donald US Patent 20010006787, A1, Juli 2001,
- 5 3. Still, et. al. US Patent 5,565,324, Oktober 1996; Still et.al., US Patent 6,001,579, März 1999
4. Norrman, Nils, Patent EP 1190256, März 2002
5. Trau, Mathias et.al. WO 99/24458, Mai 1999
6. Donath, E. et.al. WO 99/47252, März 1999
- 10 7. Spiro, A.; Lowe, M.; Brown, D. *Appl. Env. Microbiology* 66, 2000, 4258
8. Gaponik, N. Radtchenko, I.L.; Sukhorukov, G.B., Weller, H., Rogach, A.L. *Adv. Mater.* 14, 2002, 879
9. E. Donath, G.B. Sukhorukov, F. Caruso, S.A. Davis, H. Möhwald, *Angew. Chem. Int. Ed.* 1998, 37, 2002.
- 15 10. R. Steitz, V. Leiner, R. Siebrecht, R. v. Klitzing, *Colloids a. Surf. A*, 2000, 163, 63.
11. G. Ibarz, L. Dähne, E. Donath, H. Möhwald "Smart Micro- and Nanocontainers for Storage, Transport and Release" *Adv. Mater.* 13 (2001) 1324-1327.
12. L. Dähne, E. Donath, S. Leporatti, H. Möhwald, "Synthesis of micro reaction cages with defined chemical properties" *J. Amer. Chem. Soc.* 123 (2001), 5431-5436.
- 20 13. H. Härmä, "Particle technologies in diagnostics" TEKES Technology Review 126/2002

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☒ **FADED TEXT OR DRAWING**

☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.